

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年1 月29 日 (29.01.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/009817 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/40, C07K 14/08, 16/10,
C12N 5/14, A01H 5/00, C12P 21/02, C12Q 1/68

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/009086

(22) 国際出願日: 2003 年7 月17 日 (17.07.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-209805 2002 年7 月18 日 (18.07.2002) JP

(KAWAZU, Yoichi) [JP/JP]; 〒514-0113 三重県 津市 一
身田大古曾 6 7 0 一身田宿舎 A 4 0 3 Mie (JP). 杉山
慶太 (SUGIYAMA, Keita) [JP/JP]; 〒514-0043 三重県
津市 南新町 1 3-1 古川住宅 1-3 0 2 Mie (JP). 守
川 俊幸 (MORIKAWA, Toshiyuki) [JP/JP]; 〒930-0973
富山県 富山市 長江東町 2-6-3 1 Toyama (JP). 笹
谷 孝英 (SASAYA, Takahide) [JP/JP]; 〒765-0003 香川
県 善通寺市 善通寺町 7-1 2-1 4 Kagawa (JP).

(74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒
300-0847 茨城県 土浦市 卸町 1-1-1 関鉄つくばビ
ル 6 階 Ibaraki (JP).

(81) 指定国 (国内): JP, US.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独
立行政法人農業技術研究機構 (NATIONAL AGRI-
CULTURAL RESEARCH ORGANIZATION) [JP/JP];
〒305-8517 茨城県 つくば市 観音台 3-1-1 Ibaraki
(JP).

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (DE, ES, GB).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 川頭 洋一

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NUCLEIC ACID ENCODING MIRAFIORI LETTUCE VIRUS PROTEIN AND UTILIZATION THEREOF

(54) 発明の名称: ミラフィオリレタスウイルスタンパク質をコードする核酸およびその利用

(57) Abstract: An outer coat protein is purified from highly purified Mirafiori lettuce virus and its partial amino acid sequence is determined. Based on the amino acid sequence data thus determined, a primer is designed and employed in a polymerase chain reaction. Thus, a DNA encoding the outer coat protein of Mirafiori lettuce virus is cloned and its primary structure is clarified. By effecting 5' RACE with the use of a primer designed based on the sequence data thus obtained, plural DNA molecules encoding outer coat proteins of Mirafiori lettuce virus are isolated and their primary structures are successfully determined. It is found out that, using the same, a Mirafiori lettuce virus-resistant plant can be constructed and the infection with Mirafiori lettuce virus can be diagnosed.

(57) 要約: 高度に純化したミラフィオリレタスウイルスからその外被タンパク質を精製し、その部分アミノ酸配列を決定した。決定したアミノ酸配列の情報を基に設計したプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応により、ミラフィオリレタスウイルス外被タンパク質をコードするDNAをクローニングし、その一次構造を解明した。得られた配列情報を基に設計したプライマーを用いた5'RACEを実施することにより、ミラフィオリレタスウイルス外被タンパク質をコードする複数のDNA分子を単離するとともに、その一次構造を決定することに成功した。これを利用してミラフィオリレタスウイルス抵抗性植物の作出およびミラフィオリレタスウイルスの感染の診断を行なうことが可能であることを見出した。

WO 2004/009817 A1

Best Available Copy

- 1 -

明細書

ミラフィオリレタスウイルスタンパク質をコードする核酸およびその利用

5 技術分野

本発明は、ミラフィオリレタスウイルスタンパク質をコードする核酸および該核酸によりコードされるタンパク質、並びにそれらの製造および用途に関する。

背景技術

- 10 ミラフィオリレタスウイルス (MiLV) は、2000年イタリアでビッグベイン症状を示したレタスより分離され(P. Roggero et al., (2000) Archives of Virology 145: 2629-2642)、2002年にはレタスビッグベイン病の病原ウイルスはレタスビッグベインウイルス (LBVV) ではなく、本ウイルスではないかという報告がされた(H. Lot et al., (2002) Phytopathology 92: 288-293)。本ウイルスは *Olpidium*
- 15 *m brassicae* (糸状菌) によって伝搬する土壌伝搬性ウイルスで、アメリカ、日本、ヨーロッパでレタスビッグベイン病を発生させ問題となっている。本ウイルスは *Ophiovirus* に属し、3分節ゲノムのマイナス鎖RNAからなり、それぞれの大きさは8.5、1.9および1.7kbで48kDaの外被タンパクを構造タンパクとして持っていることが報告されている。本ウイルスは最近発見されたためにその遺伝子情報などは明らかとされておらず、的確な遺伝子学的な診断法の確立が行われていない。
- 20

本ウイルス病に対する抵抗性品種は数品種あるがその抵抗性は低く、また、有用な抵抗性素材も見つかっていない。そこで、本ウイルスに対する強度抵抗性の植物を作出するには、ウイルス遺伝子を植物に導入する方法が有用である。そのためにはウイルスの遺伝子配列を決定する必要がある。

25

発明の開示

5

10

15

20

25

- 3 -

ウイルス外被タンパク質をコードする複数のDNA分子を単離するとともに、その一次構造を決定することに成功した。

単離したDNA分子またはそのアンチセンス分子は、その発現により植物体にミラフィオリレタスウイルス抵抗性を付与することが可能であり、これにより植物の生産性の向上を図ることができる。また、単離したDNA分子の配列情報を基にミラフィオリレタスウイルス特異的プライマーを設計し、これを利用することによりミラフィオリレタスウイルスの遺伝診断を行うことも可能である。また、得られた配列情報を基に、ミラフィオリレタスウイルス外被タンパク質に結合する抗血清を作製して、これをミラフィオリレタスウイルスの血清学的診断法に利用することも可能である。

本発明は、以上のような知見を基に完成されたものであり、ミラフィオリレタスウイルスタンパク質および該タンパク質をコードする核酸、並びにそれらの製造および用途を提供する。より詳しくは、本発明は、

- (1) ミラフィオリレタスウイルスの外被タンパク質をコードする下記 (a) または (b) の核酸、
 - (a) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする核酸。
 - (b) 配列番号：1に記載の塩基配列のコード領域を含む、(a)に記載の核酸。
- (2) RNAである、(1)に記載の核酸、
- (3) DNAである、(1)に記載の核酸、
- (4) (2)に記載の核酸の相補鎖に相補的なセンスRNAをコードするDNA、
- (5) (2)に記載の核酸と相補的なアンチセンスRNAをコードするDNA、
- (6) (2)に記載の核酸を特異的に開裂するリボザイム活性を有するRNAをコードするDNA、
- (7) (3)に記載の核酸を含むベクター、

- 4 -

- (8) (3)に記載の核酸または(7)に記載のベクターを保持する形質転換細胞、
- (9) (1)に記載の核酸によりコードされるタンパク質、
- (10) (9)に記載のタンパク質に結合する抗体、
- 5 (11) (8)に記載の形質転換細胞を培養し、該形質転換細胞またはその培養上清から発現させたタンパク質を回収する工程を含む、(9)に記載のタンパク質の製造方法、
- (12) (4)から(6)のいずれかに記載のDNAを含むベクター、
- (13) (1)に記載の核酸、(4)から(6)のいずれかに記載のDNA、または
- 10 (7)もしくは(12)に記載のベクターを保持する形質転換植物細胞、
- (14) (13)に記載の形質転換植物細胞を含む形質転換植物体、
- (15) (14)に記載の形質転換植物体の子孫またはクローンである、形質転換植物体、
- 15 (16) (14)または(15)に記載の形質転換植物体の繁殖材料、および
- (17) ミラフィオリレタスウイルスの感染を診断する方法であって、植物細胞またはミラフィオリレタスウイルスの媒介菌である *Olpidium brassicae*における、(1)に記載の核酸または(9)に記載のタンパク質を検出することを特徴とする方法、
- 20 を提供するものである。

本発明は、ミラフィオリレタスウイルスの外被タンパク質および該タンパク質をコードする核酸を提供する。本発明に含まれる、本発明者らにより単離されたミラフィオリレタスウイルスの外被タンパク質をコードするcDNAの塩基配列を配列番号：1に、該cDNAがコードするタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：2に

25 示した。単離したcDNAは1514bpの塩基配列からなり、437アミノ酸をコードしていた。これはミラフィオリレタスウイルスの遺伝子およびタンパク質の一次構造を

示した初めての例である。

本発明のタンパク質をコードする核酸には、DNAおよびRNAが含まれる。このDNAにはcDNAおよび化学合成DNAが含まれ、また、RNAにはウイルスゲノムRNA、mRNA、合成RNAが含まれる。本発明の核酸は、当業者にとって常套手段を利用して調製することが可能である。具体的には、純化ウイルスをSDS-フェノール法などの方法で除タンパク質して調製したRNA、あるいはCTAB法などでウイルス感染葉から抽出した全核酸を鋳型として、本発明の核酸の配列から設計したプライマーあるいはランダムプライマーを用いて逆転写反応を行なうことで第一鎖DNAを合成できる。この方法で作製した第一鎖DNAから、Gubler & Hoffman法 (U. Gubler & B. J. Hoffman, (1983), Gene 25, 263) により第二鎖DNAを合成し、市販の数々のプラスミドあるいはファージミドベクターにクローニングできる。あるいは、第一鎖DNAを鋳型とし、本発明の核酸の配列から設計したプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応により本ウイルスのRNAをコードするDNAを増幅し、pGEM-Tベクターなどを用いたTAクローニング、あるいはプライマーに制限酵素サイトを付けることにより市販の数々のプラスミドベクターにクローニングできる。

本発明の核酸は、組換えタンパク質の調製やミラフィオリレタスウイルス抵抗性植物の作出に利用することもできる。

組換えタンパク質を調製する場合には、通常、本発明のタンパク質をコードするDNAを適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な細胞に導入し、形質転換細胞を培養して発現させたタンパク質を精製する。組換えタンパク質は、精製を容易にするなどの目的で、他のタンパク質との融合タンパク質として発現させることも可能である。例えば、大腸菌を宿主としてマルトース結合タンパク質との融合タンパク質として調製する方法 (米国New England BioLabs社発売のベクターpMALシリーズ)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として調製する方法 (Amersham Pharmacia Biotech社発売のベクターpGEXシリーズ)、ヒスチジンタグを付加して調製する方法 (Novagen社のpETシリーズ) な

どを利用することが可能である。宿主細胞としては、組換えタンパク質の発現に適した細胞であれば特に制限はなく、上記の大腸菌の他、発現ベクターを変えることにより、例えば、酵母、種々の動植物細胞、昆虫細胞などを用いることが可能である。宿主細胞へのベクターの導入には、当業者に公知の種々の方法を用いることが可能である。例えば、大腸菌への導入には、カルシウムイオンを利用した導入方法 (M. Mandel, & A. Higa, (1970), Journal of Molecular Biology, 53, 158-162, D. Hanahan, (1983), Journal of Molecular Biology, 166, 557-580) を用いることができる。宿主細胞内で発現させた組換えタンパク質は、該宿主細胞またはその培養上清から、当業者に公知の方法により精製し、回収することが可能である。組換えタンパク質を上記したマルトース結合タンパク質などとの融合タンパク質として発現させた場合には、容易にアフィニティー精製を行うことが可能である。

得られた組換えタンパク質を用いれば、これに結合する抗体を調製することができる。例えば、ポリクローナル抗体は、精製した本発明のタンパク質若しくはその一部のペプチドをウサギなどの免疫動物に免疫し、一定期間の後に血液を採取し、血漿を除去した血清より調製することが可能である。また、モノクローナル抗体は、上記タンパク質若しくはペプチドで免疫した動物の抗体産生細胞と骨腫瘍細胞とを融合させ、目的とする抗体を産生する単一クローンの細胞（ハイブリドーマ）を単離し、該細胞から抗体を得ることにより調製することができる。これにより得られた抗体は、本発明のタンパク質の精製や検出などに利用することが可能である。本発明の抗体には、抗血清、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、およびこれら抗体の断片が含まれる。

ミラフィオリレタスウイルス抵抗性植物を作出する場合には、ミラフィオリレタスウイルスタンパク質の産生や機能を抑制するDNAを植物細胞に導入し、これにより得られた形質転換植物細胞を再生させればよい。

ミラフィオリレタスウイルスタンパク質の産生や機能を抑制するDNAとしては、

- 7 -

ミラフィオリレタスウイルスタンパク質をコードするRNAのいずれかの鎖（センス鎖またはその相補鎖）にハイブリダイズするRNAをコードするDNAを用いることができる。

ウイルスゲノムのセンス鎖およびmRNAにハイブリダイズするRNAをコードするDNA 5 Aとしては、本発明者らにより単離された配列番号：2に記載のタンパク質をコードするDNA、好ましくは配列番号：1に記載の塩基配列のコード領域を含むDNAの転写産物に相補的なアンチセンスRNAをコードするDNAが挙げられる。ここで「相補的」とは、ミラフィオリレタスウイルスタンパク質の産生を有効に阻害できる限り、完全に相補的でない場合も含まれる。転写されたRNAは、標的とするミラフィオリレタスウイルスタンパク質をコードするRNAに対して好ましくは90%以上、
10 最も好ましくは95%以上の相補性を有する。ここで「相補性」とは、2つの配列の対応する領域を、相補的塩基対の数が最大となるように整列させた場合における、該領域における全塩基数に対する相補的塩基対を形成した塩基数の%である。

ウイルスゲノムRNAの相補鎖にハイブリダイズするRNAをコードするDNAとしては
15 、本発明者らにより単離された配列番号：2に記載のタンパク質をコードするRNA、好ましくは配列番号：1に記載の塩基配列のコード領域を含むRNAの相補鎖に相補的なセンスRNAをコードするDNAを用いることができる。ここで「相補的」とは、ミラフィオリレタスウイルスタンパク質の産生を有効に阻害できる限り、完全に相補的でない場合も含まれる。転写されたセンスRNAは、標的とするミラフィオリレタスウイルスタンパク質をコードするRNA（相補鎖）に対して好ましくは90%
20 以上、最も好ましくは95%以上の相補性を有する。

効果的に標的遺伝子の発現を阻害するには、上記アンチセンスRNAやセンスRNAの長さは、少なくとも15塩基以上であり、好ましくは100塩基以上であり、さらに好ましくは500塩基以上であり、通常、5kbよりも短く、好ましくは2.5kbよりも短い。
25

また、ミラフィオリレタスウイルスタンパク質の産生を抑制するDNAとしては、

ミラフィオリレタスウイルスタンパク質をコードするRNAの少なくとも一方の鎖を切断するリボザイムをコードするDNAを用いることも可能であると考えられる。

リボザイムとは触媒活性を有するRNA分子のことをいう。リボザイムには種々の活性を有するものがあるが、中でもRNAを切断する酵素としてのリボザイムの研究により、RNAの部位特異的な切断を目的とするリボザイムの設計が可能となった。

リボザイムには、グループ I イントロン型や、RNasePに含まれるM1RNAのように400ヌクレオチド以上の大きさのものもあるが、ハンマーヘッド型やヘアピン型と呼ばれる40ヌクレオチド程度の活性ドメインを有するものもある(小泉誠および大塚栄子, (1990), 蛋白質核酸酵素, 35:2191)。

10 例えば、ハンマーヘッド型リボザイムの自己切断ドメインは、G13U14C15のC15の3'側を切断するが、活性にはU14が9位のAと塩基対を形成することが重要とされ、15位の塩基はCの他にAまたはUでも切断されることが示されている(M. Koizumi et al., (1988), FEBS Lett. 228:225)。リボザイムの基質結合部を標的部位近傍のRNA配列と相補的になるように設計すれば、標的RNA中のUC、UUまたはUAという
15 配列を認識する制限酵素的なRNA切断リボザイムを作出することが可能である(M. Koizumi et al., (1988), FEBS Lett. 239:285、小泉誠および大塚栄子, (1990), 蛋白質核酸酵素, 35:2191、M. Koizumi et al., (1989), Nucleic Acids Res. 17:7059)。例えば、本発明の遺伝子(配列番号: 1)中には標的となりうる部位が複数存在する。

20 また、ヘアピン型リボザイムも、本発明の目的のために有用である。ヘアピン型リボザイムは、例えばタバコリングスポットウイルスのサテライトRNAのマイナス鎖に見出される(J. M. Buzayan, Nature, 323:349, 1986)。このリボザイムも、標的の特異的なRNA切断を起こすように設計できることが示されている(Y. Kikuchi & N. Sasaki, (1992), Nucleic Acids Res. 19:6751、菊池洋, (1992) 化学と生物 3
25 0:112)。

標的を切断できるよう設計されたリボザイムは、植物細胞中で転写されるよう

にカリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターなどのプロモーターおよび転写終結配列に連結される。しかし、その際、転写されたRNAの5'末端や3'末端に余分な配列が付加されていると、リボザイムの活性が失われてしまうことがある。

このようなとき、転写されたリボザイムを含むRNAからリボザイム部分だけを正確

5 に切り出すために、リボザイム部分の5'側や3'側に、トリミングを行うためのシスに働く別のトリミングリボザイムを配置させることも可能である(K. Taira et al., (1990), Protein Eng. 3:733、A. M. Dzianott & J. J. Bujarski, (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:4823、C. A. Grosshans & R. T. Cech, (1991), Nucleic Acids Res. 19:3875、K. Taira et al., (1991), Nucleic Acids Res. 19:5125)。

10 また、このような構成単位をタンデムに並べ、標的遺伝子内の複数の部位を切断できるようにして、より効果を高めることもできる(N. Yuyama et al., (1992), Biochem. Biophys. Res. Commun. 186:1271)。このようなリボザイムを用いて本発明で標的となる遺伝子の転写産物を特異的に切断し、該遺伝子の発現を抑制することができる。

15 植物細胞の形質転換に用いられるベクターとしては、該細胞内で挿入されたDNAを発現させることが可能なものであれば特に制限はない。例えば、植物細胞内での恒常的な遺伝子発現を行うためのプロモーター（例えば、カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーター）を有するベクターや、外的な刺激により誘導的に活性化されるプロモーターを有するベクターを用いることも可能である。好適な
20 ベクターとしては、例えば、pBIバイナリーベクターが挙げられる。ベクターの導入される「植物細胞」には特に制限はないが、本発明の目的から、ミラフィオリレタスウイルスが感染性を有する植物が好適である。ミラフィオリレタスウイルスが感染性を有する植物としては、レタス以外に、例えば、*Chenopodium quinoa*(アカザ科)、*Nicotiana benthamiana*(ナス科)(P. Roggero et al., (2000) Archiv
25 es of Virology 145: 2629-2642)が挙げられる。「植物細胞」の形態は、植物体への再生が可能である限り、種々の形態の植物細胞、例えば、懸濁培養細胞、プ

- 10 -

ロトプラスト、葉の切片、カルスなどが含まれる。

植物細胞へのベクターの導入は、ポリエチレングリコール法、ポリカチオン法、電気穿孔法（エレクトロポレーション）、アグロバクテリウムを介する方法、パーティクルガン法など当業者に公知の種々の方法を用いることができる。例えば、文献（S. Z. Pang et al., (1996), The Plant Journal 9: 899-909）に記載の方法は好適な方法の一例である。

形質転換植物細胞からの植物体の再生は、植物細胞の種類に応じて当業者に公知の方法で行うことが可能である。好適な再生の方法としては、例えば、文献（S. Enomoto, et al., (1990), Plant Cell Reports 9:6-9）に記載の方法が挙げられる。

一旦、ゲノム内に本発明のDNAが導入された形質転換植物体を得られれば、該植物体から有性生殖により子孫を得ることが可能である。また、該植物体やその子孫あるいはクローンから繁殖材料（例えば、種子、株、カルス、プロトプラスト等）を得て、それらを基に該植物体を量産することも可能である。本発明には、本発明のDNAが導入された植物細胞、該細胞を含む植物体、該植物体の子孫およびクローン、並びに該植物体、その子孫、およびクローンの繁殖材料が含まれる。

また、本発明は、ミラフィオリレタスウイルスの感染を診断する方法を提供する。本発明の診断方法の一つの態様は、プライマーあるいはプローブを利用したミラフィオリレタスウイルスタンパク質をコードするRNAを検出することを特徴とする方法である。このようなプローブやプライマーとしては、配列番号：2に記載のミラフィオリレタスウイルスタンパク質をコードするDNAに相同的または相補的な少なくとも15ヌクレオチドからなる核酸を用いることができる。該核酸は、好ましくは配列番号：2に記載のミラフィオリレタスウイルスタンパク質をコードするDNAに特異的にハイブリダイズする核酸である。

プライマーやプローブは必要に応じて標識されていてもよい。標識としては、例えば、放射標識が挙げられる。

- 11 -

この診断においては、例えば、ミラフィオリレタスウイルスに感染したことが疑われる植物、本ウイルスを保毒していると疑われる *Olpidium brassicae*、あるいは本菌を含む土壌から被検試料を調製し、該試料に対し、上記のプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法あるいは上記のプロープを利用したノーザ

5 ンブロットング法を実施すればよい。

本発明の診断方法の他の一つの態様は、抗体を利用したミラフィオリレタスウイルスタンパク質を検出することを特徴とする方法である。この診断に用いる抗体の調製は、例えば、得られたアミノ酸配列 (配列番号：2) から抗原領域を推定してペプチドを合成し、KLHあるいはBSAなどのキャリアタンパクに結合させ、
10 これをウサギに免疫することにより調製することができる。また、QIAexpress Type IVKit (QIAGEN社)を用いて、大腸菌で発現させたミラフィオリレタスウイルスの外被タンパク質をヒスチジンでタグgingし、得られたタンパク質をウサギに免疫することにより調製することもできる。抗体は、必要に応じて標識されていてもよい。標識としては、例えば、酵素標識が挙げられる。また、抗体自体を直接
15 標識しなくとも、抗体に結合する物質、例えば、プロテインAなどを介して標識して、目的のタンパク質を検出してもよい。

この診断においては、例えば、ミラフィオリレタスウイルスに感染したことが疑われる植物、本ウイルスを保毒していると疑われる *Olpidium brassicae*、あるいは本菌を含む土壌から被検試料を調製し、該試料に対し、上記の抗体を用いて
20 LISA法あるいはウェスタンブロット法を実施すればよい。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

25 [実施例1] ミラフィオリレタスウイルスの外被タンパク質遺伝子のクローニング

1999年に兵庫県のレタス圃場より採集した汚染土にレタスを播種し、発病株を *C. henopodium quinoa* に汁液接種し、増殖したウイルスを *C. quinoa* でさらに増殖させてウイルス純化材料とした。ウイルス純化は、Morikawaら (T. Morikawa et al., (1995), Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 61:578-581) のチューリップ微斑モザイクウイルスの精製法を改変して行った。まず、ミラフィオリレタスウイルス感染葉に、5mM Na-DIECA、0.1% (v/v) 2-メルカプトエタノール、1mM Na-EDTAを含む Tris-HCl (pH8.0) を加えてホモジナイズした。また、四塩化炭素処理を省き、最後のCsCl密度勾配遠心の代わりにCs₂SO₄の密度勾配遠心し、ウイルス画分を得た。本純化法で得られた純化ウイルスをSDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動すると、48kDaの一本のバンドのみが検出された。また、電子顕微鏡観察ではMiLVの粒子のみが観察され他の不純物が観察されなかったことより、高純度の純化ウイルスが得られていることが分かった。

ウイルス核酸の抽出は、純化ウイルスをフェノール/クロロホルム処理後、エタノール沈殿で行った。1stcDNAの作製にはp(dN)₆プライマーを用い、First-strand cDNA Synthesis Kit (amersham pharmacia biotech) によって作製した。

ペプチドマップ作成によるMiLV外被タンパク質の内部アミノ酸配列の決定は以下のようにして行った。純化MiLVを10% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後クマジー染色し、48kDaの目的のバンドを切り出し、カルボキシメチル化後、リジルエンドペプチターゼ処理した。処理後、逆相HPLCによるペプチドマッピングにより81本のパターンを得た。それらのパターンのうち数パターンについてアミノ酸の配列を決定した。

得られた数種のアミノ酸配列のうち、EGETAI (配列番号: 3) および LPTEVS (配列番号: 4) を基にdYK5プライマー (GARGGIGARACIGCIAT/配列番号: 5) およびdYK8プライマー (SWIACYTCIGTIGGIAR/配列番号: 6) を設計し、Taq DNA Polymerase (Promega) を用いてPCRを行ったところ、約750bpのPCR産物が得られた。得られたPCR産物をpGEM-T Easy Vector System (Promega) を用いてクローニング

- 13 -

し、外被タンパク質をコードする塩基配列の一部を決定した。

- MiLVは純化ウイルス中にプラス鎖とマイナス鎖両方を含むため、5' RACEのみで外被タンパク質遺伝子の全配列を決定することができる。RACE用の1stcDNAの作製にはp(dN)₆プライマーを用い、SMART RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH) によって作製した。次いで、外被タンパク質をコードする塩基配列に特異的なプライマーを用いてRACEを行い、約750bpおよび約700bpのPCR産物を得た。得られたPCR産物はpGEM-T Easy Vector System (Promega) を用いてクローニングし、塩基配列を決定した。

- 以上の方法により、配列番号：1に示した1514bpの塩基配列を決定した。本遺伝子は86塩基より翻訳がスタートし、配列番号：2に示した437残基のアミノ酸をコードしていた。

産業上の利用の可能性

- 本研究ではMiLV抵抗性の形質転換植物を作出するために、MiLVの外被タンパク質の遺伝子およびその近傍の遺伝子を決定した。本遺伝情報はMiLV外被タンパク質およびその近傍の遺伝子、あるいはそれらのアンチセンスの遺伝子を導入することによりMiLV抵抗性形質転換植物の開発が可能となる。本遺伝情報を基にしてMiLV特異的プライマーの設計によりMiLVの遺伝診断法にも利用できる。また、得られたMiLV外被タンパク質のアミノ酸配列を基にした合成ペプチドに対する抗血清、あるいは大腸菌で発現させたMiLVの外被タンパクに対する抗血清を作製し、血清学的診断法にも利用できる。

- 14 -

請求の範囲

1. ミラフィオリレタスウイルスの外被タンパク質をコードする下記 (a) または (b) の核酸。
- 5 (a) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする核酸。
- (b) 配列番号：1 に記載の塩基配列のコード領域を含む、(a) に記載の核酸。
2. RNA である、請求項 1 に記載の核酸。
- 10 3. DNA である、請求項 1 に記載の核酸。
4. 請求項 2 に記載の核酸の相補鎖に相補的なセンス RNA をコードする DNA。
5. 請求項 2 に記載の核酸と相補的なアンチセンス RNA をコードする DNA。
6. 請求項 2 に記載の核酸を特異的に開裂するリボザイム活性を有する RNA をコードする DNA。
- 15 7. 請求項 3 に記載の核酸を含むベクター。
8. 請求項 3 に記載の核酸または請求項 7 に記載のベクターを保持する形質転換細胞。
9. 請求項 1 に記載の核酸によりコードされるタンパク質。
10. 請求項 9 に記載のタンパク質に結合する抗体。
- 20 11. 請求項 8 に記載の形質転換細胞を培養し、該形質転換細胞またはその培養上清から発現させたタンパク質を回収する工程を含む、請求項 9 に記載のタンパク質の製造方法。
12. 請求項 4 から 6 のいずれかに記載の DNA を含むベクター。
13. 請求項 1 に記載の核酸、請求項 4 から 6 のいずれかに記載の DNA、または
- 25 請求項 7 もしくは 12 に記載のベクターを保持する形質転換植物細胞。
14. 請求項 13 に記載の形質転換植物細胞を含む形質転換植物体。

- 15 -

15. 請求項14に記載の形質転換植物体の子孫またはクローンである、形質転換植物体。
 16. 請求項14または15に記載の形質転換植物体の繁殖材料。
 17. ミラフィオリレタスウイルスの感染を診断する方法であって、植物細胞
5. またはミラフィオリレタスウイルスの媒介菌である *Olpidium brassicae* における、請求項1に記載の核酸または請求項9に記載のタンパク質を検出することを特徴とする方法。

1 / 12

SEQUENCE LISTING

<110> National Agricultural Research Organization

<120> Nucleic acids encoding mirafiori lettuce virus proteins and utilization thereof.

<130> ARO-A0202P

<150> JP 2002-209805

<151> 2002-07-18

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1514

<212> DNA

<213> mirafiori lettuce virus

<220>

<221> CDS

<222> (87).. (1400)

<400> 1

2 / 1 2

gattattttt taaaaatata acaagctcat aagaaaacaa cttctccact caaaagttaa 60

tcttttcaaaa gaaaaacaaa gtcaca atg tca gga gta tac aag gtt tcc gga 113

Met Ser Gly Val Tyr Lys Val Ser Gly

1

5

att cag tct atc ttg caa aaa gat gtg act tcc gaa gga gaa aca gct 161

Ile Gln Ser Ile Leu Gln Lys Asp Val Thr Ser Glu Gly Glu Thr Ala

10

15

20

25

att cta att tct ctt ggt ctc atg aca aaa gaa gag aag cct gtt cct 209

Ile Leu Ile Ser Leu Gly Leu Met Thr Lys Glu Glu Lys Pro Val Pro

30

35

40

gca aaa atg gcc atg gtg gca tct gca aaa gca aac tca atc atc ttt 257

Ala Lys Met Ala Met Val Ala Ser Ala Lys Ala Asn Ser Ile Ile Phe

45

50

55

gtt tog gaa gat ggc tct ttg tct ttt gaa gct cca aaa gaa aca gga 305

Val Ser Glu Asp Gly Ser Leu Ser Phe Glu Ala Pro Lys Glu Thr Gly

60

65

70

gag acc agc aaa cca gga gag aag aaa gag gaa aag aag gta gaa gtg 353

Glu Thr Ser Lys Pro Gly Glu Lys Lys Glu Glu Lys Lys Val Glu Val

75

80

85

3/12

gga gtc aag ttt cct ttc agc gca gcc aaa gta aag gag cta att gaa 401

Gly Val Lys Phe Pro Phe Ser Ala Ala Lys Val Lys Glu Leu Ile Glu

90

95

100

105

ggg aaa agt ctt act ttg gat cag gac aaa atc caa aaa gtg ctg gaa 449

Gly Lys Ser Leu Thr Leu Asp Gln Asp Lys Ile Gln Lys Val Leu Glu

110

115

120

gaa tat gtt aag aat ttg cca agg act gct gag act tac aaa cca aaa 497

Glu Tyr Val Lys Asn Leu Pro Arg Thr Ala Glu Thr Tyr Lys Pro Lys

125

130

135

gag att gag atc aaa tgt ttc aag ggt gtt gac ttc agt ata agc agt 545

Glu Ile Glu Ile Lys Cys Phe Lys Gly Val Asp Phe Ser Ile Ser Ser

140

145

150

ttg ctt tct tca ggg acc aaa atc tta gat gct att ctt tac agt act 593

Leu Leu Ser Ser Gly Thr Lys Ile Leu Asp Ala Ile Leu Tyr Ser Thr

155

160

165

tac aag gat tca gca gag cac aac ttc ata ttt gat gtg aaa gtt cta 641

Tyr Lys Asp Ser Ala Glu His Asn Phe Ile Phe Asp Val Lys Val Leu

170

175

180

185

tct cct gat ttc atc gat agc aag tta ctc gtg aac aac atc gaa aca 689

Ser Pro Asp Phe Ile Asp Ser Lys Leu Leu Val Asn Asn Ile Glu Thr

4 / 1 2

190

195

200

ggc aat cga gca atc aaa gca gct ttc tgt ctt gtt tac aat caa ggt 737

Gly Asn Arg Ala Ile Lys Ala Ala Phe Cys Leu Val Tyr Asn Gln Gly

205

210

215

gga ttg cca tca aag acg agt gaa gaa cga cca cta tct aag ttt gta 785

Gly Leu Pro Ser Lys Thr Ser Glu Glu Arg Pro Leu Ser Lys Phe Val

220

225

230

aga gaa acg ata ttc cgt gag aaa gat ctc aaa gct aac gag tta tgt 833

Arg Glu Thr Ile Phe Arg Glu Lys Asp Leu Lys Ala Asn Glu Leu Cys

235

240

245

gaa tat ctg tca tca gca gat cct tct ttg ttt cca agt caa gtc ttt 881

Glu Tyr Leu Ser Ser Ala Asp Pro Ser Leu Phe Pro Ser Gln Val Phe

250

255

260

265

ttg aaa atc tca ctt gaa aac ctt cct act gag gtt tca tca cgt tgc 929

Leu Lys Ile Ser Leu Glu Asn Leu Pro Thr Glu Val Ser Ser Arg Cys

270

275

280

aag atg tcg att gcg ggc aac aaa gca atg aga tat gca ctc tta gct 977

Lys Met Ser Ile Ala Gly Asn Lys Ala Met Arg Tyr Ala Leu Leu Ala

285

290

295

5 / 1 2

caa aag ttt gac aaa gat gaa att cca gtt cca aca gaa gtg aat cct 1025

Gln Lys Phe Asp Lys Asp Glu Ile Pro Val Pro Thr Glu Val Asn Pro

300

305

310

aca act agc tca gaa tac atg cag aaa aag gag aaa ata gaa aaa gca 1073

Thr Thr Ser Ser Glu Tyr Met Gln Lys Lys Glu Lys Ile Glu Lys Ala

315

320

325

aaa aag ata gtt gat gtt cta tgt tct ctt gct tct gac ttc cag gca 1121

Lys Lys Ile Val Asp Val Leu Cys Ser Leu Ala Ser Asp Phe Gln Ala

330

335

340

345

caa gtg aaa atg cat cct ctc tcc cct gag aga tca tcg agg aag aat 1169

Gln Val Lys Met His Pro Leu Ser Pro Glu Arg Ser Ser Arg Lys Asn

350

355

360

ttc act ctg caa ttg act tct gca att gtt act tca ctt tcc tac aaa 1217

Phe Thr Leu Gln Leu Thr Ser Ala Ile Val Thr Ser Leu Ser Tyr Lys

365

370

375

ggg agg tta gac atg aga aaa gca atc gaa gag aaa aag ata gag gct 1265

Gly Arg Leu Asp Met Arg Lys Ala Ile Glu Glu Lys Lys Ile Glu Ala

380

385

390

ttc aaa aga gat gaa aat ata ttt gga agg tta aat gct ctt gga caa 1313

Phe Lys Arg Asp Glu Asn Ile Phe Gly Arg Leu Asn Ala Leu Gly Gln

6 / 1 2

395

400

405

ccc acg ttt cct gtt ctg act aac gca gat gct gac ttt tct gaa ttg 1361

Pro Thr Phe Pro Val Leu Thr Asn Ala Asp Ala Asp Phe Ser Glu Leu

410

415

420

425

tca gtt gag gcc gtg aag aca gct tac gga aag aaa tga gggcagaatc 1410

Ser Val Glu Ala Val Lys Thr Ala Tyr Gly Lys Lys

430

435

ggagtgaata gtgaagaatg tggaattgtg gacagatttg cttttttccg cttatccttt 1470

gcgataggga gtatgtgaac tgatagtttt aataaaaaaac tatc

1514

<210> 2

<211> 437

<212> PRT

<213> mirafiori lettuce virus

<400> 2

Met Ser Gly Val Tyr Lys Val Ser Gly Ile Gln Ser Ile Leu Gln Lys

1

5

10

15

Asp Val Thr Ser Glu Gly Glu Thr Ala Ile Leu Ile Ser Leu Gly Leu

20

25

30

Met Thr Lys Glu Glu Lys Pro Val Pro Ala Lys Met Ala Met Val Ala

7 / 1 2

35 40 45
Ser Ala Lys Ala Asn Ser Ile Ile Phe Val Ser Glu Asp Gly Ser Leu
50 55 60
Ser Phe Glu Ala Pro Lys Glu Thr Gly Glu Thr Ser Lys Pro Gly Glu
65 70 75 80
Lys Lys Glu Glu Lys Lys Val Glu Val Gly Val Lys Phe Pro Phe Ser
85 90 95
Ala Ala Lys Val Lys Glu Leu Ile Glu Gly Lys Ser Leu Thr Leu Asp
100 105 110
Gln Asp Lys Ile Gln Lys Val Leu Glu Glu Tyr Val Lys Asn Leu Pro
115 120 125
Arg Thr Ala Glu Thr Tyr Lys Pro Lys Glu Ile Glu Ile Lys Cys Phe
130 135 140
Lys Gly Val Asp Phe Ser Ile Ser Ser Leu Leu Ser Ser Gly Thr Lys
145 150 155 160
Ile Leu Asp Ala Ile Leu Tyr Ser Thr Tyr Lys Asp Ser Ala Glu His
165 170 175
Asn Phe Ile Phe Asp Val Lys Val Leu Ser Pro Asp Phe Ile Asp Ser
180 185 190
Lys Leu Leu Val Asn Asn Ile Glu Thr Gly Asn Arg Ala Ile Lys Ala
195 200 205
Ala Phe Cys Leu Val Tyr Asn Gln Gly Gly Leu Pro Ser Lys Thr Ser
210 215 220
Glu Glu Arg Pro Leu Ser Lys Phe Val Arg Glu Thr Ile Phe Arg Glu
225 230 235 240
Lys Asp Leu Lys Ala Asn Glu Leu Cys Glu Tyr Leu Ser Ser Ala Asp

8 / 1 2

245 250 255
Pro Ser Leu Phe Pro Ser Gln Val Phe Leu Lys Ile Ser Leu Glu Asn
260 265 270
Leu Pro Thr Glu Val Ser Ser Arg Cys Lys Met Ser Ile Ala Gly Asn
275 280 285
Lys Ala Met Arg Tyr Ala Leu Leu Ala Gln Lys Phe Asp Lys Asp Glu
290 295 300
Ile Pro Val Pro Thr Glu Val Asn Pro Thr Thr Ser Ser Glu Tyr Met
305 310 315 320
Gln Lys Lys Glu Lys Ile Glu Lys Ala Lys Lys Ile Val Asp Val Leu
325 330 335
Cys Ser Leu Ala Ser Asp Phe Gln Ala Gln Val Lys Met His Pro Leu
340 345 350
Ser Pro Glu Arg Ser Ser Arg Lys Asn Phe Thr Leu Gln Leu Thr Ser
355 360 365
Ala Ile Val Thr Ser Leu Ser Tyr Lys Gly Arg Leu Asp Met Arg Lys
370 375 380
Ala Ile Glu Glu Lys Lys Ile Glu Ala Phe Lys Arg Asp Glu Asn Ile
385 390 395 400
Phe Gly Arg Leu Asn Ala Leu Gly Gln Pro Thr Phe Pro Val Leu Thr
405 410 415
Asn Ala Asp Ala Asp Phe Ser Glu Leu Ser Val Glu Ala Val Lys Thr
420 425 430
Ala Tyr Gly Lys Lys
435

9 / 12

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> mirafiori lettuce virus

<400> 3

Glu Gly Glu Thr Ala Ile

1

5

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> mirafiori lettuce virus

<400> 4

Leu Pro Thr Glu Val Ser

1

5

<210> 5

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10 / 12

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<220>

<221> modified_base

<222> (6)

<223> i

<220>

<221> modified_base

<222> (12)

<223> i

<220>

<221> modified_base

<222> (15)

<223> i

<400> 5

gargngara cngcnat

17

<210> 6

<211> 17

<212> DNA

11/12

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<220>

<221> modified_base

<222> (3)

<223> i

<220>

<221> modified_base

<222> (9)

<223> i

<220>

<221> modified_base

<222> (12)

<223> i

<220>

<221> modified_base

<222> (15)

<223> i

12/12

<400> 6

swnacytcng tnggnar

17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/09086

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/40, C07K14/08, C07K16/10, C12N5/14, A01H5/00,
C12P21/02, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/40, C07K14/08, C07K16/10, C12N5/14, A01H5/00,
C12P21/02, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE(STN), WPI(DIALOG), Genbank/EMBL/DDBJ/
GeneSeq, BIOSIS(DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	van der Wilk F. et al., Nucleotide sequence and genomic organization of an ophiovirus associated with lettuce big-vein disease., J Gen Virol.(2002 Nov), Vol.83, No.Pt 11, pages 2869 to 2877	1-17
P,X	Yoichi KAWAZU et al., Nucleotide sequence of the coat protein gene of Mirafiori lettuce virus., J Gen Plant Pathol (2003), Vol.69, No.1, pages 55 to 60	1-17
X	Roggero P. et al., An Ophiovirus isolated from lettuce with big-vein symptoms., Arch Virol. (2000), Vol.145, No.12, pages 2629 to 2642	1-17

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
07 August, 2003 (07.08.03)

Date of mailing of the international search report
19 August, 2003 (19.08.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/40, C07K14/08, C07K16/10, C12N5/14, A01H5/00, C12P21/02, C12Q1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/40, C07K14/08, C07K16/10, C12N5/14, A01H5/00, C12P21/02, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN), WPI (DIALOG),
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X	van der Wilk F, et. al., Nucleotide sequence and genomic organization of an ophiovirus associated with lettuce big-vein disease., J Gen Virol. (2002 Nov), Vol. 83, No. Pt 11, p. 2869-2877	1-17
P X	Yoichi KAWAZU, et. al., Nucleotide sequence of the coat protein gene of Mirafiori lettuce virus., J Gen Plant Pathol (2003), Vol. 69, No. 1, p. 55-60	1-17

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.08.03

国際調査報告の発送日

19.08.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 美葉子

4N

9839

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Roggero P, et. al., An Ophiovirus isolated from lettuce with big-vein symptoms., Arch Virol. (2000), Vol. 145, No. 12, p. 2629-2642	1 - 17

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.